第36卷 第4期 昆虫学报 Vol. 36, No. 4
1993年11月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Nov., 1993

烟青虫核型多角体病毒的复制和染病后血淋巴蛋白的变化

邓 塔 蔡秀玉
(中国科学院动物研究所,北京 100080)

摘要 用烟青虫 (*Heliothis assulta*) 核型多角体病毒感染5龄初烟青虫幼虫,以染病后24、48、72、96、120小时分别测定了虫体血淋巴蛋白浓度的变化。幼虫染病后24小时血淋巴蛋白浓度要高于同期对照组,72小时后染病幼虫血淋巴蛋白浓度较对照急剧下降。在染病及对照血淋巴样品中电泳分析 (PAGE) 三种蛋白(普通蛋白、糖蛋白和脂蛋白)均可分别染出22条、3条和3条带。分析结果表明,在虫体正常生长代谢过程中发生变化的主要蛋白可能大多为糖脂复合蛋白,但病毒的侵染能抑制这些变化的产生。电镜观察染病毒后幼虫的中肠组织和气管上皮组织,发现中肠染病轻微,不形成多角体。气管上皮细胞感染情况表明其属于对 NPV 感染较为敏感的组织之一,并在虫体染病后的病毒二次感染上可能起着重要作用。

关键词 烟青虫 核型多角体病毒 复制 中肠 气管上皮 血淋巴

烟青虫 (*Heliothis assulta*) 是烟草和辣椒等重要经济作物的主要害虫。1982年以来,本实验室已对烟青虫核型多角体病毒 (NPV) 的形态、毒力和病理机制等进行过研究(蔡秀玉和丁翠,1982;丁翠和蔡秀玉,1989),发现其毒力较高,在今后大田使用上有较大潜力。

昆虫血淋巴是昆虫循环系统的主要组成成分,其蛋白质的变化是昆虫新陈代谢的一个指标。而昆虫的脂肪体是血淋巴蛋白合成和分泌的中心 (Shigematsu, 1958),又是核型多角体病毒感染时虫体最敏感的复制场所(乐云仙等, 1978; Adams 和 Wilcox, 1968; Vail 和 Hall, 1969; Benz, 1963)。结合从昆虫染病后血淋巴蛋白组分和类型的变化和核型多角体病毒在脂肪体及其它组织中的侵染复制,可以比较深刻地了解虫体染病后新陈代谢的变化和它们之间的一定关系 (Young 和 Lovell, 1971; Johnson 和 Young, 1972)。笔者曾报道过烟青虫 NPV 在脂肪体细胞内的复制情况(邓塔和蔡秀玉,1989)。本文对烟青虫感染 NPV 后的部分病理学变化做了较深入的探讨。

材料和方法

一、材料:

1. 虫源:从北京郊区辣椒地采集老熟烟青虫幼虫在本实验室用半人工合成饲料(吴坤君等,1990)(26±1℃)连续几代饲养的健康烟青虫幼虫。

2. 多角体的增殖和纯化: 选取5龄中期健康幼虫用含 10^7PIB/ml 的人工饲料喂食、感染至死。按常规方法纯化多角体。

3. 电子显微镜样品制作:

本文于1991年10月收到。

（1）中肠：选取蜕皮 24 小时内的健康 5 龄初烟青虫幼虫，分别用含量 2.5×10^{7}PIB/ml 多角体的人工饲料感染。按感染后 2、5、9、16、24、48、72、96、120 小时分别取中肠，置 2.5% 戊二醛溶液中固定，每批幼虫随机取 5—8 只幼虫的中肠，再以同法选健康 5 龄烟青虫幼虫的中肠作对照。

（2）气管上皮细胞：感染多角体浓度和方法同上，按感染后 48、120 小时分别取气管上皮，置 2.5% 戊二醛中固定。

以上两种材料，在 2.5% 戊二醛中预固定两小时以上后，再经 1% 锇酸固定 1—2 小时，巴比妥等渗缓冲液冲洗，系列酒精脱水，Epon-812 包埋剂包埋，LKB-5 型切片机切片，醋酸铀与三铅复染，在 JEM-100C 型电镜下观察。

4. 幼虫血淋巴样品的制备：挑选蜕皮 24 小时内 5 龄初健康烟青虫，感染多角体浓度和方法同上，按感染后 24、48、72、96、120 小时时间取样，每次随机取样约 20 只幼虫。剪取幼虫的第一对腹足，让其血淋巴自然流出，收集在离心管内，加少许苯基硫脲结晶以防止血淋巴黑化，8000rpm 离心，上清置 −20℃冰箱保存。同样严格挑选蜕皮 24 小时内 5 龄初健康烟青虫幼虫，如上法取血淋巴作对照。

二、方法：

1. 血淋巴蛋白总浓度的测定：采用 Folin-酚法（Lowry et al., 1951）。取 50μl 血淋巴上清液用重蒸水稀释 100 倍，加入试剂 A 在 30℃ 水浴下保温 10 分钟后再加试剂 B，30℃保温 30 分钟后，在岛津 UV-250 分光光度计上比色。波长 680nm，用 BSA 作标准曲线。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳：垂直平板电泳。每槽加样量 9μl 血淋巴上清液，凝胶浓度 7.5%，Tris-甘氨酸电极缓冲液系统，pH8.3，电压 200V，电泳时间约 6 小时。

3. 蛋白染色：

（1）普通蛋白：1% 考马斯亮蓝 R250 用 12.5% 三氯醋酸稀释 20 倍后染色 12 小时，用 7.5% 三氯醋酸脱色。普通蛋白被染成深蓝色。

（2）糖蛋白：凝胶先用 2.5% 过碘酸钠醋酸混合液氧化 8 小时，放入三氯醋酸-冰醋酸混合液中洗涤，再用 Schiff-Folin 酚试剂染色过夜；硫酸氢钾盐混合液脱色后，糖蛋白被染成玫瑰红色。

（3）脂蛋白：将样品预先和苏丹黑 B 酒精饱和液按 5:1 比例混合，4℃ 冰箱过夜，电泳后用 7.5% 三氯醋酸固定脱色，脂蛋白被染成棕色。

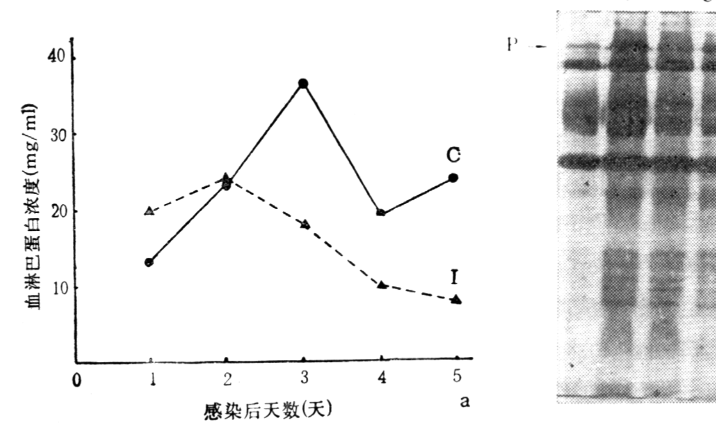
结 果 和 讨 论

一、血淋巴蛋白的变化：

1. 血淋巴蛋白总浓度的变化：5 龄初烟青虫感染 NPV 后 5 天内，血淋巴蛋白总浓度的变化及对照组如图 1a 示。可以看出健康幼虫血淋巴蛋白浓度在第 72 小时内急剧上升，第 96 小时急剧下降，至稍低于第 48 小时的蛋白浓度；第 120 小时又上升至稍高于第 48 小时的蛋白浓度水平；而同期染病的幼虫血淋巴蛋白浓度在感染病毒后 24 小时要明显高于同期的健康幼虫，第 48 小时与健康幼虫略相仿，第 72 小时后血淋巴蛋白浓度就开始急剧下降了。这一结果和部分前人的结论有所不同。在染病初期，一般的报道是染

病幼虫血淋巴蛋白浓度较健康幼虫血淋巴浓度稍低或相同(丁翠和蔡秀云，1981；Vander Geest 和 Craig, 1967; Young 等，1971)。我们知道，影响昆虫血淋巴蛋白浓度的一个主要因素是昆虫脂肪体细胞，它与血淋巴蛋白的合成代谢有关 (Shigematsu, 1958; Johnson 和 Young, 1972)。 实验结果表明，NPV 感染烟青虫后在初期可能对虫体的脂肪体代谢产生刺激作用。 Johnson 等(1972)对粉纹夜蛾感染 NPV 后其脂肪体代谢做了研究，指出：染病后第一天脂肪体细胞结合蛋白和释放蛋白增加。笔者曾报道过 5 龄烟青虫感染 NPV 后脂肪体病变电镜研究(邓塔和蔡秀云，1989)，其染病后第 24 小时约有 25% 的脂肪体细胞出现病毒发生基质，证明此时已有少数脂肪体细胞被感染。丁翠等(1989)在对烟青虫感染 NPV 后耗氧量的变化研究中指出，染病幼虫的呼吸率在 6—12 小时内出现一个高峰，18 小时后开始下降，同时正常幼虫的呼吸率一直是趋于平衡。这个结论从一个侧面也反映了病毒对虫体代谢在染病初期的刺激作用。至于前人的结果和本实验结果不同的原因，我们分析是由于感染病毒的剂量、虫种的抗病能力及取样时间等相关因素的差异引起。若都取染病后第一天的血淋巴，如果感染的剂量太大，同时虫种的抵抗力又较差，就可能在一天内使虫体严重染病，也就无法检测到染病初期虫体代谢增强的情况。反之如果感染病毒的剂量太小，在一天内不能使虫体感染上一定数量的病毒，同样难以发现这一现象。本实验选取了较合适的病毒剂量、虫种和取样时间等，并结合电镜对脂肪体细胞染病情况的观察，从而得出上述较有意义的结果。关于幼虫染病中后期血淋巴蛋白浓度的变化，我们的工作与前人的工作得出的结论是基本一致的。从脂肪体电镜观察结果来看，染病 24 小时至 120 小时，脂肪体的染病情况日渐严重，染病细胞日渐增多，至染病后第 72 小时就已大量包埋多角体，染病细胞比例也已几乎达到了 100% (邓塔等，1989)。此时的血淋巴蛋白的急剧下降及呼吸率的下降，正可以说是由于病毒在虫体内大规模复制包埋所导致的对虫体本身代谢的破坏，尤其是脂肪体细胞代谢功能的破坏的结果。

2. 血淋巴蛋白电泳结果：



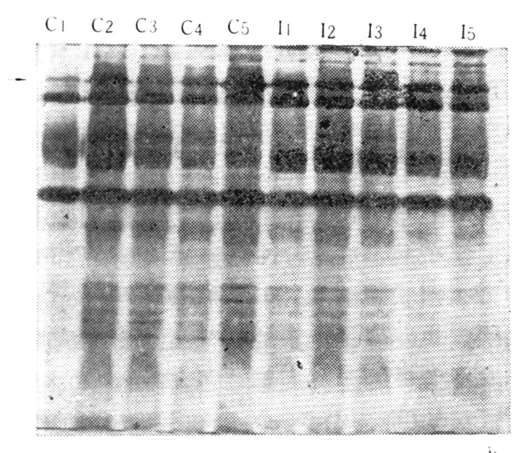


图 1a. 5 龄健康烟青虫幼虫和感染核型多角体病毒后染病幼虫血淋巴蛋白浓度的变化。 C: 健康幼虫 I: 染病幼虫
b.5 龄健康烟青虫幼虫和感染核型多角体病毒后染病幼虫血淋巴的普通蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。C1—5: 健康幼虫 1—5 天的血淋巴蛋白电泳图，I1—I5: 染病幼虫 1—5 天的血淋巴蛋白电泳图。P:示变化明显的一条蛋白带。

（1）普通蛋白：在健康5龄幼虫，第24小时直至第120小时血淋巴的 PAGE 图谱没有很大的变化(图 1b)，均可分出22条以上的蛋白带，第24小时和96小时(尤其是24小时)血淋巴蛋白带较弱。在低迁移率区域一些蛋白位置与数量有些变化。如图1b,P带蛋白在不同时期有较明显的相对量上的不同。如第24小时的血淋巴P带蛋白相对较弱，第48小时浓度增加,随后又稍降低，至120小时P带蛋白相对量明显增多。在染病的5龄烟青虫幼虫血淋巴中情况则有所不同。连续5天的血淋巴样品 PAGE 图谱没有明显变化,均能分出22条以上的蛋白带,只是第72小时以后血淋巴蛋白带趋于变弱。P带蛋白量在连续5天的血淋巴样品中都保持了相对量上的基本稳定。这个结果和前人的大部分报道都有所不同(丁翠和蔡秀云，1981; Vander Geest 和 Craig, 1969; Young 和 Lovell, 1971)。染病幼虫血淋巴之所以不象健康幼虫血淋巴蛋白那样产生一些明显可见的变化,可能是由于染病后虫体自身的发育被抑制了,病毒的侵染迫使虫体正常的代谢功能转变到病毒增殖上,取代了虫体自身的正常发育。而病毒诱导蛋白又很少向细胞外释放，也不易检测到。

（2）糖蛋白：在健康5龄幼虫，连续5天的血淋巴 PAGE 图谱糖蛋白带数无变化，都有两条分离清晰的糖蛋白带和一条较宽的糖蛋白带。但在第120小时的血淋巴中，大约相当于普通蛋白P带位置的糖蛋白带(H 带)浓度突然明显增加，其余糖蛋白带则均无变化(图 2a)。在染病幼虫、连续5天的糖蛋白图谱则无明显变化。

（3）脂蛋白：脂蛋白的 PAGE 图谱与糖蛋白十分相似(图 2b)。在健康幼虫血淋巴蛋白电泳图谱中，与普通蛋白P带迁移位置相近的脂蛋白色带（S带)有一些变化：第48小时S带较浓,而第120小时S带脂蛋白可见变为两条带。在染病幼虫中,连续5天的血淋巴脂蛋白电泳图谱均没有显示明显变化,可见到第72小时以后的脂蛋白趋于变弱。

从上述结果可以看出：普通蛋白、糖蛋白和脂蛋白的变化是有密切关系的。很可能这些电泳图谱上显示的糖蛋白、脂蛋白事实上大都是糖脂复合蛋白。只不过在不同时期其糖、脂含量会有所不同。

二、电镜观察结果：

1. 中肠与病毒的入侵和复制：从感染初期(感染后2小时)至感染晚期（120小时)中肠样品电镜观察结果表明,烟青虫中肠柱状细胞的感染较特殊。在病毒感染后72小时才见到少数中肠柱状细胞核出现病毒发生基质，有些已复制出病毒粒子大量核衣壳（图版 I:a)，而直到感染后120小时中肠细胞中有病毒发生基质的细胞核仍是少数(未超过十分之一)，未见到大量增殖病毒的情况(图版 I:a、b)。在所有中肠细胞中未观察到多角体的形成。感染病毒后48小时，在中肠细胞间质内发现少数游离病毒粒子(图版 I:c)，其一端均带有帽状膜结构,即所谓“膜粒”（peplomers)；同样，96、120小时后，在一些中肠细胞间质内也发现了大量的带“膜粒”游离病毒粒子;在染病中后期（96小时)体腔内组织间隙亦发现大量的游离病毒粒子,即所谓的未被包涵体包埋的病毒（NOV)，亦具有明显的“膜粒”结构(图版 I:c—e)。许多研究者曾作出结论，认为这种形式的病毒是主要的二次感染和连续感染的来源（Summers 和 Volkman, 1976; Granados, 1980; Granados 和 Lawler, 1981; Adams, 1977)。

一般认为,病毒多角体在虫体肠腔内溶解后,病毒粒子穿过中肠围食膜，与中肠柱状

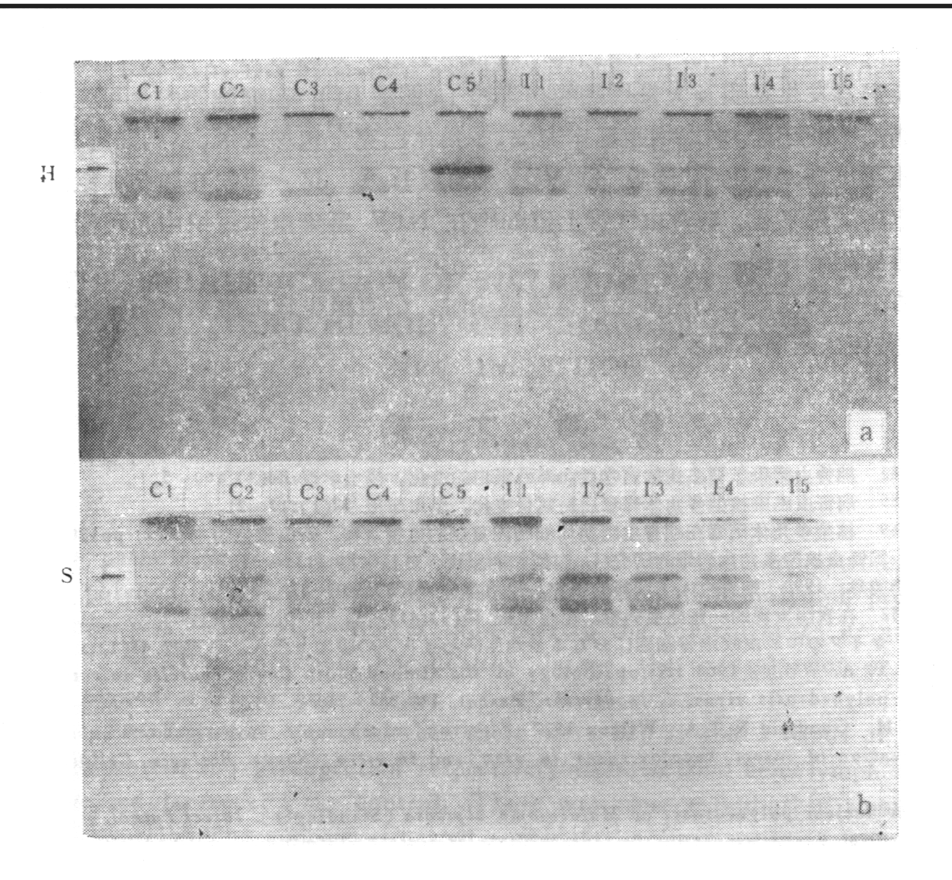


图 2a.　5 龄健康烟青虫幼虫和感染核型多角体病毒后染病幼虫血淋巴的糖蛋白电泳图。
b.　5 龄健康烟青虫幼虫和感染核型多角体病毒后染病幼虫血淋巴的脂蛋白电泳图。
C1—5：健康幼虫 1—5 天的血淋巴糖蛋白(图 1a)、脂蛋白(图 1b)电泳图 I1—5：染病幼虫 1—5 天的血淋巴糖蛋白(图 1a)、脂蛋白(图 1b)电泳图　H：示变化明显的一条糖蛋白带　S：示变化明显的一条脂蛋白带

细胞的微绒毛接触，通过吞噬作用（Tanada 和 Leulenegger, 1970）或膜融合作用（Kawanish 等，1972；Tanada 等，1975；Granados, 1978、1980；Granados 和 Lawler, 1981；Wang 和 Kelly, 1985；小林正彦，1972）进入细胞，通过核孔进入细胞核开始复制，复制后的病毒粒子再穿过基底膜进入血腔，感染其它敏感组织。在我们对中肠的大量电镜观察中，没有发现病毒粒子与微绒毛的接触，也没有在微绒毛内或染病初期在中肠细胞质或核内发现病毒粒子。这可能是由于观察的细胞仍不够多。但这个现象本身是否也暗示病毒进入虫体敏感组织的其它途径呢？ Tanada 等(1970)曾报道 GV 通过细胞间隙进入血腔，但没有见到其它类似的报道。

Granados 等(1981)曾指出，中肠复制出不形成多角体的和在其它敏感组织中形成多角体的两种病毒粒子的作用不同。前者负责组织间和细胞间的扩大感染而后者负责虫体间的感染。我们的工作表明，病毒在中肠细胞中的复制既发生得晚又很少见，也许在二次感染中不起很重要的作用。Livingston 等(1972)和乐云仙等(1978)的工作亦证明这种推测。相反，我们还可以推论，在虫体其它敏感组织大量复制病毒的情况下，中肠细胞对病毒侵染的抵抗力下降而使自己成为二次侵染的对象。

2. 气管上皮细胞染病情况：与脂肪体细胞基本相似。染病后 48 小时，已可见在细胞核内出现明显病毒发生基质及大量增殖的病毒粒子(图版 I:f)；在细胞质内也可见游离病毒粒子。染病后 120 小时，病毒增殖基本完成，多角体已完全包埋成形，充满细胞核内；在细胞间质内还可见到大量的带"膜粒"的 NOV（图版 I:g)。这一现象在脂肪体组织中还未发现。从上述结果来看，烟青虫气管上皮细胞在 NPV 感染虫体组织中也可能起着很重要的扩大再感染的作用。

同时还可观察到在周围细胞都已严重被感染时，仍有极少数细胞未被病毒侵染的情况，表明其染病往往是很不同步的。

参 考 文 献

丁翠、蔡秀玉 1981 棉铃虫感染核型多角体病毒后血淋巴蛋白的变化。昆虫学报 **24**(2):160--5。

丁翠、蔡秀玉 1989 烟青虫感染核型多角体病毒后耗氧量变化。昆虫学报 **32**(1):17—21。

邓塔、蔡秀玉 1989 核型多角体病毒在烟青虫脂肪体细胞内复制的电镜观察。杀虫微生物 Vol. 2, pp120—122。

乐云仙等 1978 棉铃虫核型多角体病毒的研究 I. 病征和病原物。复旦学报 **1**:79—85。

吴坤君、龚佩瑜、李美珍 1990 烟青虫人工饲料的研究。昆虫学报 **33**(3):301—8。

蔡秀玉、丁翠 1982 在我国发现的一些昆虫病毒。昆虫学报 **25**(4):413—5。

小林正彦 1972 カイコの中腸皮膜培養細胞における多角体病ウイルスの吸着と侵入。日蚕雑 **41**(1):1—6。

Adams, J. R. & T. A. Wilcox 1968 Histopathology of the almond moth *Cadra coutella* infected with a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invvertebr. Pathol*, **112**:269—74.

Adams, J.R., R.H. Goodwin & T.A. Wilcox 1977 Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. *Revue Biologie Cellulaire* 28: 261—8.

Benz, G. 1963 A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (Staudinger). *Insect Pathol*. **5**: 215—41.

Granados, R.R. 1978 Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus (NPV). *Virol*. **90**: 170—4.

Granados, R.R. 1980 Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology Bioengineering* 22: 1377—405.

Granados, R.R. & K.A. Lawler 1981 *In vivo* pathway of *Autograph californica* baculovirus invasion and infection. *Virol*, **108**: 297—308.

Johnson, D.R. & S.Y. Young 1972 Protein synthesis in fat body of *Trichoplusia ni* during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. *J. Invertebr. Pathol*. **19**: 219—26.

Kawanishi, C. Y., M.D. Summers, D.B. Stoltz & H.J. Arnott 1972 Entry of an insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microvillus membrane. *J. Invertebr. Pathol*. **20**: 104—8.

Livingston, J.M. & W.C. Yearian 1972 A nulear polyhedrosis virus of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: noctuidae). *J. Invertebr. Pathol*. **19**: 107—12.

Shigematsu, H. 1958 Synthesis of blood protein by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Nature* (London) **182**: 880—2.

Summers, M.D. & L.E. Volkman 1976 Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular non-occluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* host systems. *J. Virol*. **17**: 962—72.

Tanada, Y. & R. Leulenegger 1970 Multiplication of a granulosis virus in larval midgut cells of *Trichoplusia ni* and possible pathways of invasion into the hemocoel. *J. Ultrastruct. Res*. **30**: 589—600.

Tanada, Y., R.T. Hess & E.M. Omi 1975 Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* and the enhancement of a dynergistic enzyme. *J. Invertebr. Pathol*. **26**: 99—104.

Vail, P.V. & I.M. Hall 1969 The histopathology of the nuclear polyhedrosis in larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, related to symptoms and mortality. *J. Invertebr. Pathol*. **13**: 188—98.

Vander Geest, L.P.S. & R. Craig 1967 Biochemical changes in the larvae of the variegated cutworm *Peridroma sausia*, after infection with a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol*. **9**:

43—53.
Wang, X. & D.C. Kelly 1985 Baculovirus replication; uptake of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus particles by insect cells. *J. Gen. Virol.* 66: 541—50.
Young, S.Y. & J.S. Lovell 1971 Hemolymph protein of *Trichoplusia ni* during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. *J. Invertebr. Pathol.* 17: 410—8.

THE MULTIPLICATION OF *HELIOTHIS ASSULTA* NPV AND HOST HEMOLYMPH CHANGES AFTER NPV INFECTION

DENG TA　TSAI XIU-YU
(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing* 100080)

The pathological changes of *Heliothis assulta* were examined after infection with nuclear polyhedrosis virus (NPV). The concentration of hemolymph protein in infected larvae was found to be higher than that in the control at 24 hr and decreased sharply 72 hr after infection. For healthy larvae, the concentration of hemolymph protein peaked at 72 hr and 120 hr.

The PAGE pattern revealed that there were 22, 3, and 3 bands of general protein, lipoprotein and glycoprotein respectively isolated from hemolymph samples from both infected larvae and the control. There was close relationship among the three types of protein. The concentrations of some of the main proteins from the control became higher at 48 hr and 120 hr while these of corresponding bands from infected larvae remained unchanged, suggesteng that the syntheses of these proteins were inhibited by NPV infection.

Various cytological changes of mid-gut cells and tracheal matrix were detected by electron microscopy. No virus was found entered columnar cell from microvilli. The mid-gut cells were infected slightly and at later stage. No polyhedron was formed

The trachael matrix was sensitive to the infection of NPV and subsequently played an important role in repeated infection.

Key words *Heliothis assulta* ——NPV——replication——Mid-gut——tracheal matrix——hemolymph

a．5 龄烟青虫幼虫染病后 72 小时中肠细胞。核内出现病毒发生基质（Vs）和大量复制出的核衣壳（Nc）。×11000 b．5 龄烟青虫幼虫染病后 120 小时中肠细胞。核内出现病毒发生基质和大量复制出的核衣壳（Nc），未见多角体形成。×11000 c．5 龄烟青虫幼虫染病后 48 小时中肠组织。箭头示中肠组织间质内发现带"膜粒"病毒粒子。×19000 d．5 龄烟青虫幼虫染病后 120 小时中肠组织。箭头示中肠组织间质内发现大量带"膜粒"病毒粒子。×15000 e．5 龄烟青虫幼虫染病后 96 小时体腔内组织。箭头示体腔内组织间隙发现典型带"膜粒"病毒粒子。×23000 f．5 龄烟青虫幼虫染病后 48 小时气管上皮细胞。核内出现明显的多角体（P）和病毒发生基质及大量复制出的病毒粒子，细胞质内可见到游离病毒粒子（箭头指）。×12000 g．5 龄烟青虫幼虫染病后 120 小时气管上皮细胞。绝大多数细胞均已达染病后期，多角体包埋完成，仍可见少数细胞未染病，箭头示组织间质内可见大量游离病毒粒子。×3600